

Identification of European
eel juvenile by using
PCR-RFLP

Kolics, B.^{1*}
Kovács, B.²
Taller, J.¹
Várkonyi, L.²
Horváth, L.²
Kucharczyk, D.³
Müller, T.^{1*}

B. Kolics^{1*}
B. Kovács²
J. Taller¹
L. Várkonyi²
L. Horváth²
D. Kucharczyk³
T. Müller^{1*}

1. Pannon Egyetem Georgikon Kar
H-8360 Keszthely, Deák F. u. 16.

* e-mail: bkolics@gmail.com,
muller.tamas@mkk.szie.hu

2. SZIE Mezőgazdaság- és Környezet-
tudományi Kar Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet,
Halgazdálkodási Tanszék
Gödöllő

3. Department of Lake and River
Fisheries, Faculty of Environmental
Science, University of Warmia and
Mazury in Olsztyn, Poland

Európai angolna ivadékának fajmeghatározása PCR-RFLP- módszerrel

ÖSSZEFOGLALÁS

Egy faj pontos meghatározása a CITES-fajok esetében kritikus jelentőségű, különösen azok illegális szállítása esetén. Egy közelmúltban történt eset világított rá ennek jelentőségére, ahol is több mint félmillió ismeretlen eredetű és fajú angolnalárvát foglalt le a reptéri rendőrség (Liszt Ferenc Nemzetközi Repülőtér, Budapest). A lefoglalt szállítmányt érintően megelőző döntéshozatal volt szükséges, amely a gyors fajmeghatározási technológiák fontosságára világított rá. Angolnafajok esetében a hagyományos morfológiai alapú eljárások félrevezetőek lehetnek, és bizonyos lárvakorban nem is alkalmazhatók. Ezzel szemben a molekuláris módszer pontos és gyors fajmeghatározást tesz lehetővé. A szerzők egy sejtmagi gén, az FSH 100 bp hosszú szakaszát szaporították fel; az európai (*A. anguilla*) és a japán (*A. japonica*) angolna közti különbséget PCR-RFLP-eljárással mutatták ki. A nukleáris markerekre alapozott molekuláris eljárások széles körben használhatóak, a faj meghatározásán kívül hibridizációs vizsgálatokban is.

SUMMARY

Species discrimination is crucial in illegal transport of CITES species. A recent case at the Hungarian International Airport (Budapest, Hungary) where over half a million of individuals of unidentified juvenile eel (*Anguilla* sp.) were seized also called for a prompt decision and reflected the importance of rapid techniques identification. Instead of morphological investigation, that could be misleading and unapplicable in certain juvenile developmental stage, molecular methods proved to be the eligible way of eel species discrimination. A nuclear marker, a 100bp fragment of the FSH gene was used to distinguish the European eel (*A. anguilla*) and Japanese eel (*A. japonica*) in glass eel stage using PCR-RFLP technique. Molecular method based on nuclear markers enables a wide range of identification as species discrimination of any developmental stage and also hybrid testing.

A Washingtoni Egyezmény a veszélyeztetett vadon élő állat- és növényfajok nemzetközi kereskedelméről (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) II. kategóriába sorolja az európai angolnát (*Anguilla anguilla*): nem fenyegeti a kihalás közvetlen veszélye, de befogásukra és kereskedésükre súlyos korlátozások vonatkoznak. Az angolna egy másik fajának, a japán angolnának (*A. japonica*) a kereskedelmét nem szabályozza a CITES.

Az európai angolna és a japán angolna ivadékeinak morfológiai elkülönítése bizonytalan

A szerzők a NAV által lefoglalt angolnaivadék-szállítmány faji meghatározását végezték el

RFLP-módszerrel vizsgálták az FSH-gén PCR-rel sokszorozított szakaszát

A Washingtoni Egyezmény alapján az európai angolna befogására és kereskedelmére súlyos korlátozások vonatkoznak

A két faj természetes elterjedési területén kívül is kereskednek angolnával (az egyik járulékos hozadéka volt az *Anguillicoides crassus* japán angolnában élő úszóhólyagféreg behurcolása európai vizekbe, amely parazita kártétele a balatoni állományban is érzékeny veszteségeket okozott [3, 9]), így a két faj ivadékeinak elkülönítése különösen fontos. Fontos kiemelni, hogy morfológiai bélyegek alapján az elkülönítésük nehéz (6), és nem minden esetben biztos. A két faj elkülönítésére először mitokondriális markerekre alapozott molekuláris technikák váltak ismertté (1, 6, 8). Az anyai öröklődésű marker azonban bizonyos esetekben (pl. hibridvizsgálatnál) nem alkalmazható. Ennek alternatívája a mikroszatellit alapú megközelítés (4), azonban a módszer csak korlátozottan alkalmas fajok elkülönítésére, költségesebb és időigényes az egyszerűbb PCR-RFLP-eljárásokkal szemben.

ANYAG ÉS MÓDSZER

2014. április 23-án a Nemzeti Adó- és Vámhivatal pénzügyőrei összesen 183 kg tömegű (kb. 610 ezer egyed) angolnaivadékot (*Anguilla* sp.) foglaltak le két kínai utas csomagjaiból a Liszt Ferenc Nemzetközi Repülőtéren. A rendelkezésre álló információk alapján felmerült annak a lehetősége, hogy az angolnaivadékok a japán angolnafajba tartoznak, így szállításuk engedélyeztetése más elbírálás alá esik. Kutatócsoportunkat felkérték a lefoglalt szállítmány faji meghatározására a további intézkedések meghozatala céljából.

Ötven véletlenszerűen kiválasztott angolnaivadékot vizsgáltunk meg a jellemző morfológiai bélyegek alapján (postanalis és dorsanalis testhosszok lemérése), és 12 példányt választottunk ki véletlenszerűen DNS-marker alapú vizsgálatra (1. ábra). Japánangolna-kontrollnak korábbi vizsgálatainkból származó mintákat használtunk, míg európaiangolna-kontrollnak Balatonból származó egyede úszómintáját használtunk fel. Az európai angolna és a japán angolna hibridizációjának igazolását a két faj FSH-génjében található pontmutációra alapozva végeztük el (PCR-RFLP) (5). Az erre a faji különbségre tervezett molekuláris genetikai markerrel egyértelműen igazolni lehet a minták faji hovatartozását. A DNS-kivonás Qiagen DNEasy Tissue Kittel történt; 12 példányból 11 esetben jó minőségű (nem fragmentált) és megfelelő koncentrációjú (80–170 ng/μl) DNS-t sikerült kivonni. A DNS-kivonást követően a mintákon a következő összetevőkkel indítottunk PCR-t 12 μl végtérfogatban: egyenként 1,2 μM Primer; egyenként 0,2 μM DNTP; 1,5 U Taq-polimeráz enzim 10× pufferrel (Thermo Scientific, Litvánia); 2 mM MgCl₂; 1 μl templát-DNS (100 ng). Alkalmazott PCR-profil: 94 °C 2 perc előmelegítést követően 33 ciklus a következő hőmérsékletekkel és idővel: 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s. Végső extenzió: 72 °C 5 perc. Az európai (EA+) és a japán angolna (JP+) elkülönítésére használt marker (5'-CAACAGGCT-GCAACTTCA and 5'-CTCAGAGCCACAGGGTAGGT) az FSH-gén egy 100 bp hosszú szakaszát szaporítja fel. Végül a PCR-termékeket *Rsa*I restrikciós endonukleázzal kezeltük: 1 μl enzimet adtunk közvetlenül 10 μl PCR-termékehez. Az enzim az európai angolna szekvenciáját a 40. bázispárnál elvágja, míg a japán angolnából

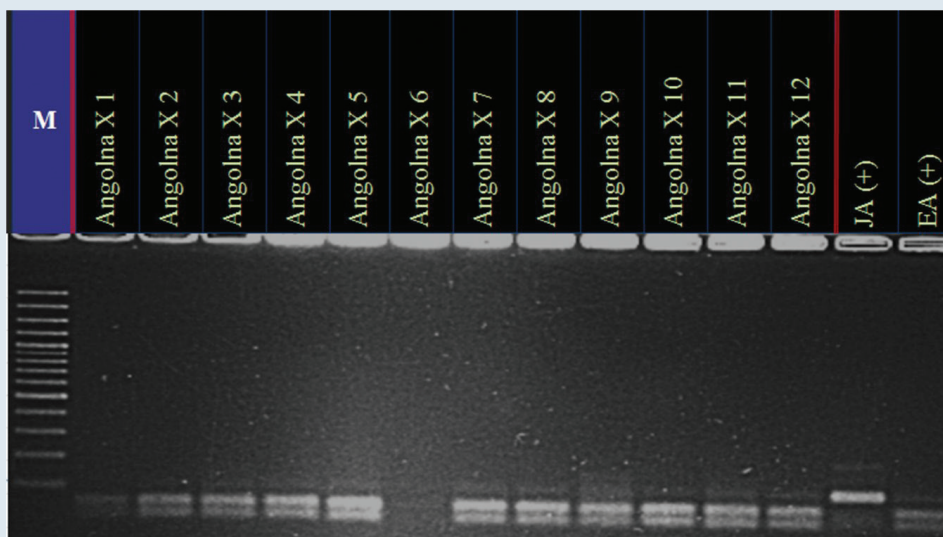
1. ÁBRA. Az egyik vizsgált angolnaminta

FIGURE 1. One of the investigated specimen



2. ÁBRA. A PCR termékek RFLP mintázata Rsa I enzim-mel, 1,5%-os agaróz gélen

FIGURE 2. Measurements taken on the eel specimens (n = 50)



M-DNS súlymarker (DNA Ladder Plus, Thermo Scientific) 100 bp, 3,5 µL. Az Angolna X 1-12 40 és 60bp nagyságú termékeket eredményezett, csakúgy, mint a kontrollként használt európai angolna (EA+). Az azonos PCR-reakcióból származó fragment a második kontrollként használt japán angolna esetében (JA+) érintetlen maradt az emésztés során.

M-DNA Ladder Plus 100 bp, 3.5 µL. Angolna 1-12 gave digested fragments of 40 and 60 bp, same as the European eel used for control (EA+). Fragment from the prior PCR reaction remained undigested in the case of the Japanese eel sample used as the second control (JA+).

származó fragmentet érintetlenül hagyja. A termékeket az emésztést követően 3%-os agarózgélen (Prolabo, Németország) választottuk el, és 1,5%-os etídium-bromiddal festettük meg.

A vizsgált minták testhossza és testtömege nem mutatott erős összefüggést ($y = 0,0781x - 0,2842$, $r^2 = 0,47$), ami különböző korú gyűjtött egyedekre utal, és/vagy egyik részük már megkezdte a táplálkozást és a növekedést, míg másik felük a metamorfózist követő pigmentációt nem fejezte be, táplálkozást még nem kezdte meg. SILFVERGRIP (7) által megadott elkülönítő bélyeg alapján az ivadékokat nem lehetett egyértelműen besorolni (Táblázat).

A molekuláris vizsgálatok során egy minta (eel 6; 20 ng/µl) kis koncentrációjú DNS-t adott, ami a minta tárolására volt visszavezethető.

A marker DNS-szakasz nukleotidsorrendjében egyetlen bázispár különbség van az európai és a japán angolna között. Ezt az SNP-t (Single Nucleotide Polymorphism) RsaI restrikciós enzimemésztéssel, gélelektroforézis segítségével vizualizáltuk. A PCR-termékek restrikciós endonukleáz-emésztése a vártnak megfelelően intakt, 100 bp nagyságú fragmentet eredményezett a japán angolna

Az RsaI-enzim az európai angolna esetében a PCR-terméket egy 60 és egy 40 bp hosszúságú fragmentre hasítja

TÁBLÁZAT. Angolnák felvett adatai (n = 50)**TABLE** Measurements taken on the eel specimens (n = 50)

	Testtömeg (g)	Teljes test-hossz (mm)	Postanalis hossz a dorsanalis hossz függvényében		
			saját mérés	SILFVERGRIP (7) alapján	
				európai angolna	japán angolna
Átlag ± szórás	0,29 ± 0,05g	73,3 ± 4,4	6,22 ± 0,77		
Min.–max.	0,21–0,42	6,14–8,47	4,6–7,8,	5–5,2	5,6–6,0

A vizsgált minták európai angolnafajba tartoztak

kontrollmintája esetében, míg az európai angolna kontrollmintájából származó fragmentet az enzim egy 60 és egy 40 bp hosszúságú fragmentre hasította. A vizsgált mintákból származó kiindulási PCR-terméket az enzim az utóbbihoz hasonlóan minden vizsgált minta esetében elhasította. A vizsgált minták az európai angolnafajba tartoztak.

MATSUBARA és mtsai egy kísérletben (3) mikroszatellit alapú vizsgálatokkal igazolták az *A. japonica* és az *A. anguilla* fajok hibridizációját. E módszer esetben azonban előzetes információval kell rendelkezni a szülői alléleket illetően. A génbanki adatbázisokból elérhető *A. australis* és *A. marmorata* fajok FSH-génre alapozott *in silico* vizsgálataink szerint e fajok elkülönítése is lehetséges lehet a génszekvencia polimorfizmusára alapozva. A korábban leírt PCR-RFLP alapú módszer (2) markerei a 18S rDNS-régiót célozzák, nem mutat allélpolimorfizmust az *A. anguilla* és az *A. japonica* fajok között, csak az *A. australis*, *A. rostrata* és *A. luzonensis* fajok elkülönítésére használható. Az általunk használt markerek egyértelmű, gyors és olcsó detektálási lehetőséget nyújtanak a japán és az európai angolnafajok elkülönítésében, továbbá azok hibridjeinek elkülönítésére is alkalmasak.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatást a KMR_12-1-2012-0435, a Bolyai János kutatási ösztöndíj (BO 54/12/4) és a Nemzeti Kiválóság Program (8526-5/2014/TUDPOL azonosító számú) pályázata támogatta.

IRODALOM

1. AOYAMA, J. – WATANABE, S. et al.: Discrimination of catadromous eels of genus *Anguilla* using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of the mitochondrial 16S ribosomal RNA domain. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 2000. 129. 873–878.
2. BURGERHOUT, E. – BRITTIJN, S. A. et al.: First artificial hybrid of the eel species *Anguilla australis* and *Anguilla anguilla*. *BMC Dev. Biol.*, 2011. 11 (1). 16.
3. CSABA G. – LÁNG M. – SÁLYI G. – RAMOTSA J. – GLÁVITS R. – RÁTZ F.: Az *Anguillicola crassus* (Nematoda, Anguillicolidae) fonálféreg és szerepe az 1991. évi balatoni angolnapusztulásban, *Magy. Állatorv. Lapja*, 1993. 48. 11–21.
4. MATSUBARA, H. – NOMURA, K. et al.: Can the hybrid between Japanese eel and European eel grow? *Newslett. Jpn. Soc. Comp. Endocrinol.*, 2010. 36. 133–139.
5. MÜLLER, T. – HORVÁTH, Á. et al.: Artificial hybridization of Japanese and European eel (*Anguilla japonica* × *A. anguilla*) by using cryopreserved sperm from freshwater reared males. *Aquaculture*, 2012. 350. 130–133.
6. KESZKA, S. – PANICZ, R. – KEMPTER, J.: Eel species identification by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Med. Weter.*, 2009. 65. 315–318.
7. SILFVERGRIP, A. M.: CITES identification guide to the freshwater eels (Anguillidae): with focus on the European eel *Anguilla anguilla*. Swedish environmental protection agency, 2009.
8. MINEGISHI, Y. – YOSHINAGA, T. et al.: Species identification of *Anguilla japonica* by real-time PCR based on a sequence detection system: a practical application to eggs and larvae. *ICES J. Mar. Sci: Journal du Conseil.*, 2009. 66. 1915–1918.
9. SZÉKELY, Cs. – LÁNG, M. – CSABA, G.: First occurrence of *Anguillicola crassus* in Hungary. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 1991. 11. 162–163.

Közlésre érke.: 2015. feb. 13.